

Item 1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-177891

(43)Date of publication of application : 10.07.1990

(51)Int.Cl.

C12P 19/30
 // (C12P 19/30
 C12R 1:85)
 (C12P 19/30
 C12R 1:72)

(21)Application number : 63-334782

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 28.12.1988

(72)Inventor : SHUKKE SAKANORI
SUGURI TOSHIAKI

(54) METHOD FOR SYNTHESIZING CYTIDINE-5'-MONOPHOSPHOSIALATE BY CONJUGATED ENZYMIC REACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To industrially and advantageously obtain the subject compound useful as a biosynthesis precursor, etc., by reacting a specific microorganism and cytidine-5'-monophosphosialate synthetase with a substrate containing 5'-cytidine monophosphate and sialic acid in an organic solvent.

CONSTITUTION: A microorganism, belonging to the genus *Saccharomyces* or *Candida* and having the ability to produce cytidine-5'-triphosphate and a cytidine-5'-monophosphosialate synthetase derived from an animal or microorganism are reacted with a substrate containing 5'-cytidine monophosphate and sialic acid in the presence of an organic solvent, such as octanol, toluene or phenol, in the same reaction system to carry out synthetic reaction of the cytidine-5'-triphosphate from 5'-cytidine monophosphate with the microorganism and synthetic reaction of cytidine-5'-monophosphosialic acid with the synthetase derived from the animal or microorganism in the same reaction system. Thereby, the objective compound is obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 平2-177891

⑫ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成2年(1990)7月10日
 C 12 P 19/30 8214-4B
 // (C 12 P 19/30
 C 12 R 1:85)
 (C 12 P 19/30
 C 12 R 1:72)

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

④ 発明の名称 複合酵素反応によるシチジン-5'-モノホスフォシアル酸の合成方法

② 特願 昭63-334782
 ② 出願 昭63(1988)12月28日

⑦ 発明者 出家栄記 埼玉県狭山市入間川2-23-5-102
 ⑦ 発明者 須栗俊朗 東京都荒川区西尾久7-14-7
 ⑦ 出願人 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
 ⑦ 代理人 弁理士 宮田 広豊

明細書

1. 発明の名称

複合酵素反応によるシチジン-5'-モノホスフォシアル酸の合成方法

2. 特許請求の範囲

(1) 5'-シチジンモノリン酸およびシアル酸を含む基質に、サッカロミセス属もしくはキャンデイダ属に属するシチジン-5'-トリリン酸生産能を有する微生物と、動物あるいは微生物由來のシチジン-5'-モノホスフォシアル酸合成酵素とをオクタノール、トルエンもしくはフエノール等の有機溶媒存在下の同一反応系において作用させて、上記微生物による5'-シチジンモノリン酸からシチジン-5'-トリリン酸への合成反応と、動物あるいは微生物由來の上記合成酵素によるシチジン-5'-トリリン酸とシアル酸からのシチジン-5'-モノホスフォシアル酸への合成反応とを同一系内で行うことを特徴とするシチジン-5'-モノホスフォシアル酸の合成方法。

(2) シアル酸がN-アセチルノイラミン酸である請求項(1)に記載のシチジン-5'-モノホスフォシアル酸の合成方法。

(3) シアル酸がN-グリココリルノイラミン酸である請求項(1)に記載のシチジン-5'-モノホスフォシアル酸の合成方法。

(4) シアル酸がD-アセチルノイラミン酸である請求項(1)に記載のシチジン-5'-モノホスフォシアル酸の合成方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、生体内に存在し、シアル酸転移酵素の基質であるシチジン-5'-モノホスフォシアル酸(以下CMP-シアル酸と略記する)を短時間の反応により高収率で合成する方法に関する。

従来技術

CMP-シアル酸は、広く生体内に分布していて生理上重要な働きをしていることが知られている。

特開平 2-177891(2)

因に、シアル酸は20種以上のノイラミン酸誘導体の総称であつて、アミノ基がアセチル化されたN-アセチルノイラミン酸、アミノ基がグリコリル化されたN-グリコリルノイラミン酸、さらにはシアル酸の1分子に置換基が存在するo-アセチルノイラミン酸等を包含する。例えば、糖タンパク、糖脂質、オリゴ糖等の複合糖類の生合成前駆体として存在し、生化学的試薬あるいは医薬として、その価値が重要視されている。

本発明が対象とするCMP-シアル酸の合成法については、Schauer, et al の報告 (Hoppe Seyler's 2.「フィロジカル ケミストリイ(Physiol. Chem.) 353, 883-886 (1972)) がある。

上記方法は、シチジン-5'-トリリン酸（以下 CTPと略記する）とシアル酸を基質とし、これに牛頸下腺由来のシチジン-5'-モノホスフォシアル酸合成酵素（以下 CMP-シアル酸シンターゼと称する）を作用させて CMP-シアル酸を合成することからなる。しかし、この合成法は基質とし

て用いる CTP が高価であるため工業的製法としては実用性に乏しい。

一方、基質である CTP の製造法として CMP あるいはシチジン等を含む反応液に、サッカロミセス属 (Saccharomyces)、キャンディダ属 (Candida) 等の微生物の菌体もしくは乾燥菌体等を作用させることにより、CTP を比較的高収率で合成する方法（特公昭51-27754号）が提案されている。

しかし、上記方法を利用して CMP-シアル酸を合成するには、該方法により精製して得られた CTP を基質としシアル酸とともに、CMP-シアル酸シンターゼを作用させ、反応させるという2工程の組み合わせが必要であり、各工程毎に複雑な作業工程をともなうもので工業上有利な合成法とは言えない。

因に、従来の上記2工程方式では、CTP を反応液から活性炭やイオン交換樹脂を用いて精製する必要があり、長時間の繁雑な工程を要するという問題もある。

3

4

発明が解決しようとする課題

本発明者らは、CMP-シアル酸を工業的により効率よく合成するための方法について検討した結果、5'-シチジンモノリン酸（以下 CMPと略記する）から CTPへの合成反応と、CTPとシアル酸から CMP-シアル酸への合成反応をオクタノール、トルエンもしくはフエノール等の有機溶媒存在下の同一反応系において、1工程で行い、効率よく上記目的物質を合成し得る方法を達成し本発明を成すに至った。

すなわち、本発明は CTP の合成反応と CMP-シアル酸合成反応を、オクタノール、トルエンもしくはフエノール等の有機溶媒存在下の同一系内で行うことにより、CMP-シアル酸を極めて短時間で、効率よく合成するための方法を提供することを課題とする。

発明の構成

本発明の特徴は、CMP およびシアル酸を含む反応液（基質）に、サッカロミセス属等に属する

CTP 產生能を有する微生物と、CMP-シアル酸シンターゼとを同時的に反応させてオクタノール、トルエンもしくはフエノール等の有機溶媒存在下の同一系内において CMP-シアル酸を合成することにある。

課題を解決するための手段

本発明において用いる微生物は、サッカロミセス属、キャンディダ属等に属する酵母であつて、菌体自体、菌体破碎物、菌体抽出物、もしくは乾燥菌体等の形態で使用し得る。

ここで利用する微生物としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、製パン用市販乾燥パン酵母（オリエンタル酵母社製）、さらにはキャンディダ・ユーティリス (Candida utilis) を例示できる。これら微生物の培養はその特性に応じて行われるが、通常の微生物の培養に用いられる培地で行われる。例えば、炭素源として、乳糖、グルコース、ガラクトース、ショ糖等、窒素源として、ペプトン、肉エキス、

5

—742—

6

特開平 2-177891(3)

酵母抽出物を含む培地を用いることができる。なお、市販パン用乾燥酵母はこのまま用いることができる。

また、本発明で用いられる C M P - シアル酸シンターゼは、牛頭下腺から抽出精製したものが用いられるが、必ずしも高度に精製したものでなくともよく、部分精製したものでも有効に用い得る。

本発明では、上記微生物および C M P - シアル酸シンターゼを C M P およびシアル酸を基質とした同一反応系に添加して作用させる。

この場合、反応開始時間は pH を 7.0~8.5、温度を 30°C に保持し、8~12 時間作用させることが好ましい。また、反応系における各原料物質は C M P を 10~30 mM 濃度、シアル酸を 5~30 mM 濃度、及びリン酸緩衝液 0.1~0.3 M 濃度とし、上記酵素、例えば乾燥酵母菌体を 5~20% (w/v)、C M P - シアル酸シンターゼを 5~10% (v/v) の組成割合で用いることが好ましい。なお、反応における補助因子としてマグネシウム塩 ($MgSO_4$ 等) を 10~30 mM

濃度の割合で添加することが好ましい。このものは、酵母のエネルギー生成反応に関与する酵素及び C M P - シアル酸シンターゼを活性化する。

さらに、本発明では反応系にオクタノール、トルエンもしくはフエノール等を添加して存在させることが必要であつて、上記有機溶媒の存在により C M P - シアル酸の生成が促進される。また、反応進行の際、苛性ソーダ溶液あるいはアムモニア水溶液等を用いて反応系の pH を 7.0~8.0 に維持することが好ましい。

上記 C M P とシアル酸を含む基質と上記酵素をオクタノール、トルエンもしくはフエノール等の有機溶媒存在下の同一反応系で作用させると、酵母の作用による C T P からの C T P 合成反応と、C M P - シアル酸シンターゼによる C T P とシアル酸からの C M P - シアル酸の合成反応が同一系内で効率良く行われ、C M P - シアル酸が従来の 2 工程の組み合わせから成る方法に比べて非常に短時間かつ簡便に合成される。

7

上述のようにして得られた C M P - シアル酸は、必要に応じて、イオン交換樹脂およびゲル濾過剤で処理して分離精製される。

以下に実施例を示して本発明を更に具体的に説明する。

実施例

乾燥酵母の調製

市販パン用乾燥酵母（オリエンタル酵母社製）を乾燥酵母として用いた。

C M P - シアル酸シンターゼの調製

500 g の牛頭下腺に、1000 mL トリス緩衝液 (0.1 M 濃度、pH 8.0) を加えミキサー等でホモジナイズした。次に、得られた懸濁液を 12,000 XG で 15 分間遠心分離し、沈澱物を除いた。得られた上清液約 1000 mL を C M P - シアル酸シンターゼの粗酵素として用いた。

C M P - N - アセチルノイラミン酸の合成

C M P 20 mM、N - アセチルノイラミン酸 5 mM、グルコース 0.8 M、硫酸マグネシウム 30 mM を含む 0.1 M

8

リン酸緩衝液 0.1 M (pH 7.5) 10 mL に、上記方法により調製した乾燥酵母 1000 g 及び C M P - シアル酸合成酵素 500 mL を添加し、更に 20 mL オクタノールを添加した混液を 30°C で 8 時間反応させた。反応の進行に際して 2 N 苛性ソーダ溶液により反応系の pH を 7.0~8.0 に維持した。上記方法により、2.0~3.0 mM の C M P - N - アセチルノイラミン酸を生成した。

C M P - N - グリコリルノイラミン酸の合成

前記 C M P - N - アセチルノイラミン酸の合成において基質の 1 つである N - アセチルノイラミン酸に代えて N - グリコリルノイラミン酸を用いることにより、同量の C M P - N - グリコリルノイラミン酸を生成した。

C M P - o - アセチルノイラミン酸の合成

前記 C M P - N - アセチルノイラミン酸の合成において基質の 1 つである N - アセチルノイラミン酸に代えて o - アセチルノイラミン酸を用いることにより、同量の C M P - N - アセチルノイラミン酸を

特開平 2-177891(4)

生成した。

なお、上記オクタノールに代えてトルエン又は
フェノールを用いても同様の結果が得られる。

出願人 雪印乳業株式会社

代理人 宮 田 広 豊

1 1